



Università degli Studi di Verona

Dipartimento di Biotecnologie

RELAZIONE SCIENTIFICA ANNUALE

*Messa a punto di un protocollo sperimentale per l'analisi proteomica di proteine poco abbondanti e sua applicazione.
Assegno di Ricerca (AdR 2004/12)*

<i>Nome e Cognome del Beneficiario</i>	Dott. Pidutti Paolo
<i>Titolo del Programma di Ricerca</i>	Messa a punto di un protocollo sperimentale per l'analisi proteomica di proteine poco abbondanti e sua applicazione
<i>Settore Scientifico Disciplinare di riferimento</i>	CHIM/01 Chimica Analitica
<i>Nome e Cognome del Responsabile Scientifico</i>	Dott.ssa Cecconi Daniela
<i>Durata dell'Assegno di Ricerca (da...a...)</i>	01/12/2012 – 30/11/2014
<i>Periodo di riferimento della relazione (da...a...)</i>	01/12/2013 – 30/11/2014
<i>Note (es.: eventuali periodi di sospensione dell'Assegno, etc.)</i>	



Università degli Studi di Verona

Dipartimento di Biotecnologie

DESCRIZIONE DELL'ATTIVITÀ DI RICERCA (*presupposti/obiettivi, metodologie applicate, risultati intermedi raggiunti, discussione*)

Il progetto prevede la messa a punto di un protocollo efficace per l'analisi proteomica di proteine poco abbondanti, per il loro prefrazionamento, separazione tramite elettroforesi bidimensionale ed identificazione in spettrometria di massa.

Lo scopo del progetto è stato quello di purificare ed identificare peptidi aventi attività antimicrobica, noti come batteriocine, di batteri lattici appartenenti al genere *Lactobacillus* (*L. salivarius*).

Poiché sono già note alcune salivaricine (batteriocine prodotte da ceppi di *L. salivarius*), il ceppo *L. salivarius* è stato selezionato per primo per la caratterizzazione di tali peptidi attraverso metodiche di proteomica e chimica analitica.

Inizialmente è stata valutata la curva di crescita del ceppo *L. salivarius* SGL03 in un terreno di coltura minimo (privo di fonti azotate proteiche e peptidiche), messo a punto appositamente per evitare interferenze con l'analisi delle eventuali batteriocine secrete nel surnatante di fermentazione. Sulla base dei dati ottenuti dalla curva di crescita è stato selezionato il momento migliore per la raccolta del surnatante, scelto in modo tale da avere la minore interferenza possibile da parte della normale lisi cellulare a cui vanno incontro i batteri durante la fermentazione.

Il surnatante di fermentazione è stato quindi raccolto mediante sistemi di filtrazione con pori da 0.22 μm di diametro.

Successivamente le proteine presenti nel surnatante sono state precipitate con acido tricloroacetico e, mediante vari passaggi in centrifuga e lavaggi con solventi organici, sono state concentrate e purificate dal terreno di coltura.

Un'aliquota del surnatante di fermentazione è stato quindi concentrato di circa 150 volte utilizzando dei concentratori con cut-off da 3 kDa. Il surnatante concentrato è stato poi trattato con catalasi e portato a pH neutro con NaOH, ed è stato saggiato per l'attività antimicrobica mediante il test di inibizione *Agar Well Diffusion* su vari ceppi patogeni. I ceppi indicatori risultati positivi (inibiti) al saggio d'inibizione, sono stati selezionati per i successivi esperimenti.

La frazione proteica del secretoma del ceppo *L. salivarius* è stata successivamente caratterizzata mediante analisi bidimensionale in SDS-PAGE, sfruttando gel di acrilammide a porosità tale da permettere una separazione ottimale dei peptidi nel gel stesso. Dopo la corsa elettroforetica i gel sono stati colorati sfruttando diversi metodi di colorazione quali SYPRO-Ruby, Silver Staining e Blu di Coomassie, e le bande a basso peso molecolare sono state tagliate e digerite per l'analisi in spettrometria di massa al fine di identificare i peptidi secreti dal *L. salivarius* SGL03.

Allo scopo di individuare quali tra i peptidi identificati fossero responsabili dell'inibizione della crescita dei ceppi patogeni risultati positivi nell'*Agar Well Diffusion Assay*, i gel sono stati sfruttati per prove di analisi di inibizione *in situ* su piastre di terreni di coltura agarizzati e seminati con il ceppo patogeno di interesse.

In seguito sono stati affrontati protocolli di separazione della frazione proteica del secretoma di *L. salivarius* SGL03 mediante *High Performance Liquid Chromatography* (RP-HPLC). A tale scopo, i peptidi purificati dal terreno di coltura (frazionati con un cut-off da 10 kDa per selezionare solo quelli a basso PM) sono stati separati in HPLC con colonna C18, andando a raccogliere frazioni dell'eluato da sottoporre al test *Agar Well Diffusion*. Le frazioni risultate positive all'*Agar Well Diffusion Assay* sul ceppo patogeno di interesse sono state quindi digerite per l'identificazione in spettrometria di massa.



Università degli Studi di Verona

Dipartimento di Biotecnologie

Per completare il progetto si rende necessario ripetere l'analisi RP-HPLC con un maggior quantitativo di campione di partenza, andando a raccogliere le frazioni di eluato a intervalli più brevi, liofilizzarle, ed analizzarle sia in SDS-PAGE che in *Agar Well Diffusion* con il ceppo patogeno sensibile, allo scopo di ottenere almeno un pool di peptidi tra i quali sia possibile individuare (mediante successivi esperimenti) quello responsabile dell'attività antimicrobica.

Una volta identificati i peptidi ad attività inibitoria si tratterà di effettuare la loro caratterizzazione.

Verrà determinata la MIC (minima concentrazione inibente) utilizzando diluizioni del campione contenente la batteriocina ed il ceppo patogeno indicatore.

Inoltre si eseguirà la caratterizzazione delle batteriocine andando a saggiare la loro sensibilità al calore, al pH, agli additivi alimentari ed agli enzimi. Si potrà anche valutare la possibilità di effettuare saggi per analizzare l'assorbimento delle batteriocine alle cellule target.

Infine l'ultimo step del progetto è l'ottimizzazione di un terreno di coltura per massimizzare la produzione delle batteriocine. Partendo dal terreno minimo di base verrà valutato l'effetto delle diverse fonti di carbonio, di azoto, e di vitamine sulla quantità finale di batteriocine prodotta del ceppo di *L. salivarius* SGL03.

Tutto il disegno sperimentale messo appunto potrà quindi essere applicato ad altri ceppi di batteri lattici, per identificare ulteriori nuove batteriocine.

DESCRIZIONE DELL'ATTIVITÀ DI RICERCA SVOLTA ALL'ESTERO (eventuale)



Università degli Studi di Verona
Dipartimento di Biotecnologie

DESCRIZIONE DELL'ATTIVITÀ SVOLTA NELL'AMBITO DEL DOTTORATO DI RICERCA <i>(eventuale)</i>

--

DESCRIZIONE DELL'ATTIVITÀ DIDATTICA COLLEGATA <i>(eventuale)</i>

--

SEMINARI/CONFERENZE TENUTI

--



Università degli Studi di Verona
Dipartimento di Biotecnologie

RISULTATI DELLA RICERCA (*pubblicazioni, rapporti, brevetti, etc.*)

Il Responsabile Scientifico

(Firma)

L'Assegnista di Ricerca

(Firma)